

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-262598

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)10月25日

C 07-K 15/04  
A 61-K 37/02  
37/64

ZNA

8619-4H  
8615-4C  
8615-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全10頁)

⑭ 発明の名称 ヒト抗トロンビンⅢの変異体

⑮ 特 願 平2-14712

⑯ 出 願 平2(1990)1月24日

優先権主張 ⑰ 1989年1月24日 ⑱ 西ドイツ(DE) ⑲ P3901917.9

⑳ 発 明 者 ゲルト、ツェットルマ イスル ドイツ連邦共和国ランタール、アム、ホーフアツカー、15

㉑ 発 明 者 ヘルマン、エリヒ、カ ルゲス ドイツ連邦共和国マールブルク、ゾンネンウエーク、32

㉒ 出 願 人 ベーリングベルケ、ア クチエンゲゼルシャフ ト ドイツ連邦共和国マールブルク、1

㉓ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名  
最終頁に続く

## 明 細 書

## 1 発明の名称

ヒト抗トロンビンⅢの変異体

## 2 特許請求の範囲

1. 位置 Trp 49、Gln 96、Gln 135、Gln 155、Gln 192、Arg 393、Thr 394において単独でまたは組み合わせで変異を含む、抗トロンビンⅢ変異体。

2. 表2に示される変異を単独でまたは組み合わせで含む、請求項1に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

3. 表2に示される変異 No. 1、2または3と表2に示される変異 No. 7~10の一つまたはそれ以上をともに含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

4. 表2に示される変異 No. 7~10の一つまたはそれ以上を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

5. 表2に示される変異 No. 1を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

6. 表2に示される変異 No. 2を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

7. 表2に示される変異 No. 3を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

8. 表2に示される変異 No. 4を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

9. 表2に示される変異 No. 5を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

10. 表2に示される変異 No. 6を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

11. 表2に示される変異 No. 7を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

12. 表2に示される変異 No. 8を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

13. 表2に示される変異 No. 9を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

14. 表2に示される変異 No. 10を含む、請求項2に記載の抗トロンビンⅢ変異体。

15. 請求項1～14のいずれか1項に記載の変異体をコードするcDNAの、適当な原核または真核生物発現系中での発現を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の変異体の製造法。

16. 請求項1～14に記載の変異体の一つまたはそれ以上を含んでなる、薬剤。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は、野生型ATⅢ（アンチトロンビンⅢ）と比較して改良された性質を有する、ATⅢの変異体（mutants）に関する。一つまたはそれ以上の可能なグルコシル化（glycosylation）部位（例えばAsn135およびAsn155）における修飾は、ATⅢのプロテアーゼ特異性を保ちながらヘパリン結合／ヘパリン活性化の性質を向上させる。位置Arg393における変化は、プロテアーゼに対する特異性の変化をもたらす。一般に、変異（mutation）の組合せは改良を促進する。

ヒト抗トロンビンⅢ（ATⅢ）をコードするcDNAおよび大腸菌（*E. coli*）におけるその発

現、セリンプロテアーゼトロンビンはATⅢと反応すると、それはArg393-Ser394結合を切断して、共有結合のATⅢ-トロンビン複合体を形成する。トロンビンは複合体形成（complexation）においてそのプロテアーゼ活性を失う。ヘパリンの非存在下では、ATⅢはトロンビンの比較的弱いインヒビターである。ヘパリンの最適濃度は、少なくとも2000倍（factor）のレベルでATⅢ-トロンビン結合反応の速度定数（rate constant）を増加させる（Hoylaertsら：J. Biol. Chem., 1984, 259, 5670-5677）。ヒトの血漿中には二つの型のATⅢ（アルファおよびベータ）が存在しており、これらはヘパリンに対して異なる親和性（affinity）を有している（PetersonおよびBlackburn：J. Biol. Chem., 1985, 260, 610-615、Brennanら：FEBS LETT., 1987, 219, 431-436）。血漿中90～95%の範囲で存在するATⅢアルファはAsn残基96、135、155および192に炭水化物側鎖を有するの

現は、欧州特許出願EP第0 090 505 A2号明細書に記載されている。ATⅢの発現は、さらに、組換え酵母（EP第0 256 302 A2号明細書）および哺乳動物細胞（DE第3 624 453 A1号明細書）において示されている。これらの実験から、哺乳動物細胞によって培養培地に分泌されるATⅢのみがインビトロでの完全な生物学的活性を示し、血漿タンパク質と非常に似た複雑な炭水化物（carbohydrate）構造を有しているということが明らかになった（Zettlmeisslら：BioTechnology, 1987, 5, 720-725）。

哺乳動物細胞からの組換えATⅢの約58kdの分子量は、血漿から精製されたタンパク質のものに相当する。成熟ヒトATⅢのアミノ酸配列は表1に示される通りである。

ATⅢは、タンパク質のセルピン（serpin）類のひとつであり、したがって、 $\alpha$ -1抗トリプシン、 $\alpha$ -2抗プラスミン、ヘパリン補因子Ⅱ、 $\alpha$ -1抗キモトリプシン、プラスミノゲン活性化因子（activator）インヒビターなどのプロテアーゼイ

対して、ATⅢベータにおいては位置96、155および192のみが占められている。二つのATⅢの型の生理学的役割は知られていない。

管理された（directed）突然変異誘発の技術によってATⅢcDNAへの特異的変化の導入が可能である。これはATⅢのアミノ酸組成の修飾をもたらす。1本鎖DNAまたはヘテロ二本鎖（heteroduplex）DNAを用いる管理された突然変異誘発の方法は開示されている（Morinagaら：BioTechnology, 1984, 7, 636-639、Kramerら：Nucl. Acid Res., 198, 12, 9441-9456）。表2は、ヒトATⅢの管理された突然変異誘発に用いられるオリゴヌクレオチドのいくつかを例示したものである。

一つまたはそれ以上のグリコシル化部位Asn96、Asn135、Asn155およびAsn192において、異なるアミノ酸、好ましくはGln、を有する変異体が今調製され、これはプロテアーゼ特異性を保ちながらヘパリン結合／ヘパリン活性化の性質を増進する。さらに、位置

Arg 393で修飾された変異体（好ましくは Met または Val への変異（mutation））を調製した。これは酵素特異性の修飾（改良）をもたらす。

ヘパリン結合／ヘパリン活性化の性質を向上させた変異体は、適宜、より低いヘパリン量を治療に用いることが可能であることから、ATⅢ／ヘパリン併用治療において有利である。

一方、特異性変異体は、可能なヘパリン活性化のATⅢの性質を新たなプロテアーゼ（例えばエラスターゼ、プラスミンなど）に対する親和性を有する突然変異した分子へ移すことができる新たな分子を結果としてもたらす。したがって、この型の分子は、投与量を変えることによって有利な方法で治療の政策を変えることを可能にする。

突然変異したATⅢタンパク質を、哺乳動物細胞において発現して、標準法によって精製して、それらのプロテアーゼ特異性またはそれらのヘパリン活性化の性質、生物化学的／生物物理学的性質および／またはそれらの臨床的パラメーターに

よる消化によってプラスミド p $\beta$ AT6（EP第0 256 302 A2号明細書）から単離した。このフラグメントを突然変異誘発ベクター pMA5-8（第1図）のポリリンカー（EcoRI／HindⅢで切断した）にクローニングした。その結果得られるプラスミドを pMAATⅢと称した（第2図）。

突然変異誘発を行った後に（「突然変異誘発」の項を参照されたい）、突然変異させたcDNAを SacⅡ／XbaⅠによる切断によって単離して、同様に SacⅡ／XbaⅠで消化しておいた発現ベクター pAB3-1にクローニングした

（ATⅢ野生型）。その結果、プラスミド pABmut が得られた（第3図）。

pABmut プラスミドは、特有の突然変異したcDNAに加えてSV40初期エンハンサー／プロモーターユニット、初期転写のためのSV40ポリアデニル化（polyadenylation）部位およびCMV迅速初期エンハンサー（Zettlmeisslら：前出）を有している。

pABmut プラスミドをCsCl勾配で精製

について調べることが可能である。ATⅢの修飾体の合成は、高発現率を迅速にもたらすベクター／宿主細胞系（system）によって達成される

（Zettlmeisslら：Behring Inst. Mitt., 1988, 82, 28-34）。

したがって、本発明は次のようなATⅢ変異体に関する。

（1）グリコシル化部位 Asn 96、Asn 135、Asn 155 および Asn 192 の一つまたはそれ以上において異なるアミノ酸、好ましくは Gln、を有しており、

（2）位置 Arg 393 において修飾されており（好ましくは Met または Val への変異）、

（3）一般に改良を促進する、変異（1）および（2）の組合せを有する。

本発明は諸例および特許請求の範囲にさらに記載される通りである。

#### 例1：ATⅢ変異体の合成（一般法）

ヒトATⅢcDNAの全コード領域を含む1.4 kbのフラグメントを、EcoRI／HindⅢに

して、Zettlmeisslら（前出）による記載のようにしてプラスミド pSV2dhfr および pRMH140でBHK細胞（ATCC CCL10）中で共トランスフェクション（cotransfection）させた。DME 増地 + 10% FCS + 400  $\mu$ g/ml G418 および 1  $\mu$ M メトトレキセート

（methotrexate、標準増殖増地）中での二重選択後に得られる耐性クローン（約40～100）をクローン混合物としてT25培養器に集めた。混合されたクローンをT80およびT180培養器を介して標準増殖増地中でブラステックローラーボトル（1750 cm<sup>2</sup>）に広げて、そこにコンフルエントになるまで付着培養させた。コンフルエントになった細胞を200 mlのIscoveの増地

（Behringwerke AG、Marburg）で2回（それぞれ37℃で2時間）洗浄して、次いで500 mlの同じ増地を回収増地（harvest medium）として48時間回転させた。回収増地を細胞成分から遠心分離によって分離した。調整した回収増地の各一部をとり、ヒトATⅢに特異性のあるELISAに

よってそれらのA T III抗原含有量を調べた (Zettlmeissl ら: BioTechnology, 1987, 5, 720-725)。このようにして測定した野生型A T III (A T III-W T) および種々の突然変異体 (mutant) の発現レベルは、表3に例示する通りである。

A T III-W T およびそれから派生した突然変異したタンパク質を標準法 (ヘパリン・セファロースを用いるアフィニティークロマトグラフィーとそれに続く分画硫酸アンモニウム沈澱) (Zettlmeissl ら: 1987) によって回収増地から精製して、次いで特徴付けを行った。

変異体A T III分子は、また種々の永久哺乳動物細胞系において技術状態に応じて他の発現ベクターを用いても発現させることができる。

**例2:** 突然変異誘発ノ一般法 (Kramer ら: Nucl. Acids Res., 1984, 12, 9441-9456)

大腸菌W K 6株で形質転換させておいた突然変異誘発ベクターp M A A T III (第2図) の一本鎖DNAを標準法によって単離した。

緩衝液 (fill-in buffer) (625 mM KCl, 275 mM トリス-HCl (pH 7.5), 150 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 0.5 mM ATP および各0.25 mM の四つのdNTP)、1  $\mu$ l のT4 DNAリガーゼ (5 U/ $\mu$ l) および1  $\mu$ l のDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント (1 U/ $\mu$ l) を加えて、室温で45分間インキュベートした。5  $\mu$ l の埋填ギャップ二本鎖DNAでW K 6 muts (mutS215:Tn10) を形質転換させた。全形質変換混合物をLB増地+25  $\mu$ g/ml クロラムフェニコール (10 ml) 中での振盪培養で37°Cで一晩増殖させる。プラスミドDNAを全混合物から標準法 (Maniatis ら: 1982) によって精製した。約20 ngの精製プラスミドでW K 6を形質転換させた。形質転換体を25  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールを含むLBプレート上で選択した。

これらの形質転換体の5個について適当な配列反応 (C-, T-, A-またはG-特異性) によって所望の突然変異を分析した。陽性のクローンを突

p M C 5-8のプラスミドDNA (第1図の説明を参照されたい) をEcoRI/HindIIIで切断して、ベクターフラグメント (3.8 kb) をアガロースゲルからベーパー抽出 (Maniatis ら: Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor, New York) によって精製した。

ギャップ二本鎖 (gapped duplex) DNAを得るために、0.1 pmolの二本鎖フラグメント (p M C から) および0.5 pmolの一本鎖DNA (p M A A T III) を12.5 mM トリス-HCl (pH 7.5) + 190 mM KCl (最終容量40  $\mu$ l) 中で100°Cで4分間加熱して、次いで65°Cで10分間インキュベートした。突然変異誘発オリゴヌクレオチド (表2を参照されたい) 上でのハイブリダイゼーションのために、8  $\mu$ l の該ハイブリダイゼーション溶液を4~8 pmol (2  $\mu$ l) の酵素的に燐酸化したオリゴヌクレオチドと65°Cで5分間加熱して、次いで徐々に室温に冷却した。24  $\mu$ l のH<sub>2</sub>O、4  $\mu$ l の10×埋填

然変異誘発部位の領域の詳細な配列分析によって確認した (Sanger ら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 74, 5463-5467)。

**例3:** A T III-Met 393: A T III-Val 393 およびA T III-Leu 393

$\alpha$ 1抗トリプシン (エラスターゼインヒビター) と同様の特異性を有する分子を形成する目的で、A T IIIのArg 393 (P1位置) をMet、ValまたはLeuに変換した。表2からのオリゴヌクレオチドNo. 1、2および3を突然変異誘発に用いた。

突然変異体は、BHK細胞によって合成されて、A T III野生型 (W T) に匹敵する量で培養増地に放出され (表4)、これはウサギからの抗A T III血清に対してA T III-血清およびA T III-W Tと同一の反応を示して、A T III-W Tと類似して上記の標準法によって95%以上の純度で精製することができる。これら突然変異体のヘパリン・セファロース上での結合および抽出の性質は、A T III-W Tと違わない。このことは、突然変異体のヘバ

リン結合およびヘパリン活性化の性質がそのまま保持されていることを示す。

突然変異体はもはやトロンビンに対する累進的な阻害活性 (Hensen ら: Thromb. Diath. Haemorrh., 1983, 9, 18-29) またはヘパリン補因子活性 (Schrader ら: Aerztli. Lab., 1986, 32, 111-114) を有していない (表3)。

A T III-W T と対照的に、三つの突然変異体は白血球エラスターゼを阻害する。エラスターゼは、ヒト白血球から Engelbrecht らの記載による方法 (Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chemie, 1982, 363, 305-315) で単離された。用いられた基質は、Nakajima ら (J. Biol. Chem., 1979, 254, 4027-4032) による記載の MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (Calbiochem) であった。基質からのパラニトロアニリンの遊離を15分以内の405nmにおける吸光度の増加として分光光度計によって測定した。この吸光度をPMNエラスターゼ酵素の100%活性と定義した。インヒビターを最高100μg/

mlにまであげた濃度で酵素とともに1時間ブレインキュベーションした。次いで酵素反応を基質とともに始めた。分析を0.1mol/リットルHEPES (pH 7.5) + 0.1mol/リットル塩化ナトリウム中で行った。基質濃度は0.13mmol/リットルであった。IC50を、酵素活性の50%を阻害する阻害濃度 (μg/ml) として定義した。最高濃度の100μg/mlにおいて阻害作用を示さない物質を不活性と称した。用いた参照インヒビターは、α1プロテアーゼインヒビター (α1PI, α1抗トリプシン) であって、これは阻害値3.7を有した。A T III-W T は、PMNエラスターゼ活性の阻害を示さなかった。A T III-Valはα1PIに匹敵する4.0μg/mlの活性を示したが、A T III-MetおよびA T III-Leuは明かに活性がより低く、それぞれ28および65μg/mlであった (続く表を参照されたい)。

記述のPMNエラスターゼ分析を、α1PIとの比較によってA T III-Val393のKIの決定に用いた。用いた基質MeO-Suc-Ala-

Ala-Pro-Val-pNAの濃度は、0.0011, 0.0022, 0.0044, 0.0087, 0.0175, 0.035, 0.7mmol/リットルであった。インヒビターの濃度は $3.5 \times 10^{-5}$ mol/リットルであった。

両方の場合で、pMNエラスターゼの阻害は非競合的阻害であった (続く表を参照されたい)。α1PIおよびA T III-Val393のKI値は、実質的に同一である。

#### 例4: A T III-Gln135およびA T III-Gln155

発明として本出願において請求される実験の一つの目的は、A T III分子中のグリコシル化の、A T IIIの生物学的および生物化学的性質に及ぼす影響を調べることにある。位置135および155におけるAsn→Gln変換を、それぞれ炭水化物側鎖を欠いている二つのA T III突然変異体 (A T III-Gln135およびA T III-Gln155) の産生に用いた。用いた突然変異誘発オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド8および

9 (表2) であった。BHK細胞 (A T IIIは培養増地中) における両突然変異体の発現率は、表4に示されるように、A T III-W Tと同じオーダーの大きさである。両突然変異体は特異的累進的阻害活性およびヘパリン補因子活性に関して、ウサギからの抗-A T III血清に対してA T III-血清およびA T III-W Tと同一の反応を示す (表4)。これらを上記の標準法によって95%以上の純度で精製することができる。

二つの突然変異体を、分析中のヘパリン濃度を関数としてそれらのトロンビン不活性化能 (比較値) を調べて、A T III-血清、A T III-W Tおよび突然変異体A T III-Lys49と比較した (表5)。

分析は次の条件下で行った。0.02U (抗原)/ml A T III (A T III-血清、A T III-W TまたはA T III-Mut) を、0.3IU/mlのα-トロンビン (ヒト)、2KIU/mlのアプロチニン (Behringwerke) および0~25IU/mlの濃度の1mlの容量のヘパリン (Hoffmann-LaRoche) とともに37℃で5分間ブレインキュベーションした。

100  $\mu$ lの基質試薬(2mM HD-CHA-BuI-Arg-pNA)を加えた後、405nm(37℃)における吸光度(extinction)の変化を動力学的に(kinetically)追跡した。ヘパリン飽和における $\alpha$ -トロンビンの最大阻害を100%と設定した。

突然変異体ATIII-Gln135およびATIII-Gln155による低ヘパリン濃度におけるトロンビンの阻害はATIII-血漿およびATIII-WTよりも良好であった(表5)。

表5には、ATIII-血漿、ATIII-WTおよび種々のATIII突然変異体についての1/2最大(half-maximum)トロンビン阻害(c1/2)におけるヘパリン濃度が示されている。

#### 例5: ATIII-Gln135/155

例4に記載の突然変異を、オリゴヌクレオチド8および9(表2)を用いる連続的突然変異誘発によって一つのATIII分子において組合わせた。突然変異したタンパク質は記載の標準精製法において組換え野生型ATIII分子のように挙動する。

ATIII-Gln135およびATIII-Gln

155について見出された低ヘパリン濃度における $\alpha$ -トロンビンの増進された阻害は、ATIII-Gln135/155の場合にはよりいっそう顕著である(表5)。

表1

```

1  HGSPVDICTA KPRDIPMNPM CIYRSPEKKA TEDEGSEQKI PEATNRRVWE
51  LSKANSRFAT TTYQHLADSK NDNDNIFLSP LSISTAFAMT KLGACNDTLQ
101 QLMFVFXFDT ISEKTSQDIH FFFAKLNCRL YRKANKSSKL VSANRLFGDK
151 SLTFNETYQD ISELVYGAKL QPLDFKENAE QSRAAINKWV SNKTEGRITD
201 VIPSEAINEL TVLVLVNTIY FKGLWKSDFS PENTRKELFY KADGESCSAS
251 MMYQEGKFRY RRVAEGTQVL ELPFKGDDIT MVLILPKPEK SLAKVEKELT
301 PEVLQEWLDE LEEMMLVVHM PRFRIEDGFS LKEQLQDMGL VDLFSPEKSK
351 LPGIVAEGRD DLYVSDAFHK AFLEVNEEGS EAAASTAVVI AGRSLNPNRV
401 TFKANRPFLV FIREVPLNTI IFMGRVANPC VK

```

表2

突然変異誘発オリゴヌクレオチドの例

No.	配列	突然変異
1	5' GGG GTT TAG CGA <u>CAT</u> GCC AGC AAT CAC 3'	Arg393-Met
2	5' GGG GTT TAG CGA <u>AAC</u> GCC AGC AAT CAC 3'	Arg393-Val
3	5' GGG GTT TAG CGA <u>AAG</u> GCC AGC AAT CAC 3'	Arg393-Leu
4	5' GGG GTT TAG <u>CGT</u> ACG GCC AGC 3'	Ser394-Thr
5	5' GGG GTT TAG <u>CAT</u> ACG GCC AGC 3'	Ser394-Met
6	5' GGA CAG TTC <u>CTT</u> GAC ACG CCG G 3'	Trp49-Lys
7	5' G GAG GGT GTC <u>CTG</u> ACA GGC ACC CAG C 3'	Asn96-Gln
8	5' GGA GGA TTT <u>CTG</u> GGC TTT TCG	Asn135-Gln
9	5' G GTA GGT CTC <u>CTG</u> GAA GGT AAG G 3'	Asn155-Gln
10	5' CG GCC TTC GGT CTT <u>CTG</u> GGA CAC CC 3'	Asn192-Gln

表3

ヒト多形核顆粒球からのエラスターゼ (PMNエラスターゼ) の阻害

物質	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	K <sub>i</sub> (mol/l)
α <sub>1</sub> PI	3.7	1.7 × 10 <sup>-8</sup>
ATIII-WT	-	n.d.
ATIII-Met393	28.0	n.d.
ATIII-Val393	4.0	1 × 10 <sup>-8</sup>
ATIII-Leu393	65.0	n.d.

- = 阻害無し (IC<sub>50</sub> > 100 μg/ml)

n.d. = 非測定

表4

A T III突然変異体の発現および精製

	α-ラー血清 <sup>1)</sup> 中濃度 (mg/l)	標準法に よる精製	P I <sup>2)</sup> (U/mg)	H C <sup>3)</sup> (U/mg)
ATIII-血漿	-	+++	4-6.5*	4-6.5*
ATIII-WT	4.2	+++	6.2	5
ATIII-Met393	5.5	+++	0	0
ATIII-Val393	4.8	+++	0	0
ATIII-Leu393	9.8	+++	0	0
ATIII-Thr394	9.7	+++	n.d.	3.5
ATIII-Lys49	3.3	++	4.6	4.3
ATIII-Gln135	8	+++	3.9	4.5
ATIII-Gln155	3.6	+++	4.2	5.5
ATIII-Gln135/155	1.2	+++	n.d.	3.8

1) BHK細胞の40時間無血清上清 (ELISA)

2) 凝達の阻害活性 (Hensenら: 1963)

3) ヘパリン補因子活性 (Schraderら: 1986)

n.d. = 非測定

\* = バッチ依存性変動範囲

表5

トロンビン不活化のヘパリン濃度依存性

	C1/2 ( $\mu$ IU/ml)
AT III-血漿	65
AT III-VT	65
AT III-Gln135	22
AT III-Gln155	22
AT III-Gln135/155	5
AT III-Lys49	360 以上

1) 1/2 最大比トロンビン阻害におけるヘパリン濃度

## 4 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミド pMAC5-8 (= pMA5-8 および pMC5-8) の地図を示す、説明図である。図中、FI-ORI: ファージ f1 の複製開始点、ORI: ColE1 型の複製開始点、CAT: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのコード領域、AMP:  $\beta$ -ラクタマーゼのコード領域。pMA5-8 は CAT 中 (位置 3409 の A) にアンバー (amber) 突然変異を有し、pMC5-8 は AMP 中 (位置 2238 の C) にアンバー突然変異を有する。

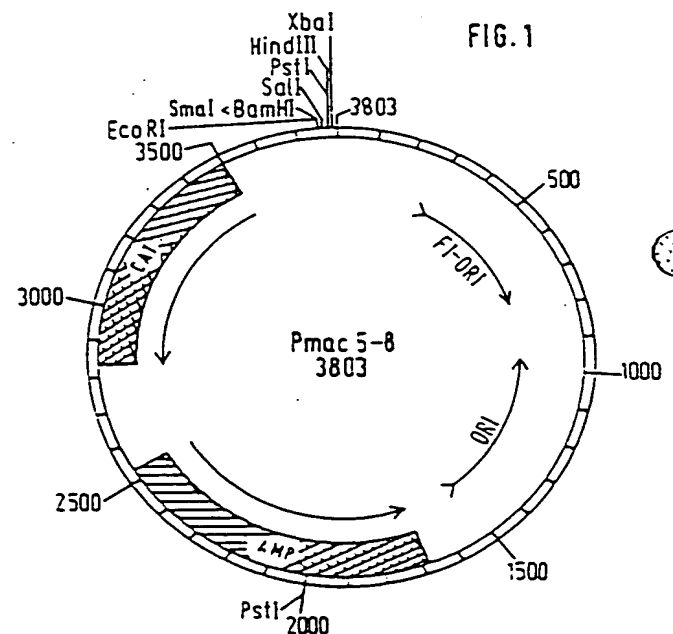
第2図は、突然変異誘発ベクター pMAAT III を示す、説明図である。

第3図は、プラスミド pABmut を示す、説明図である。

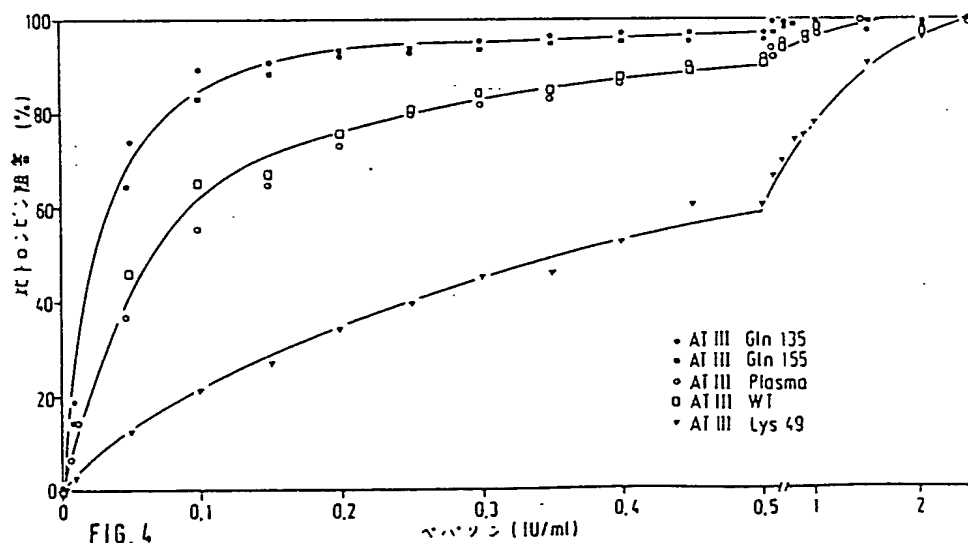
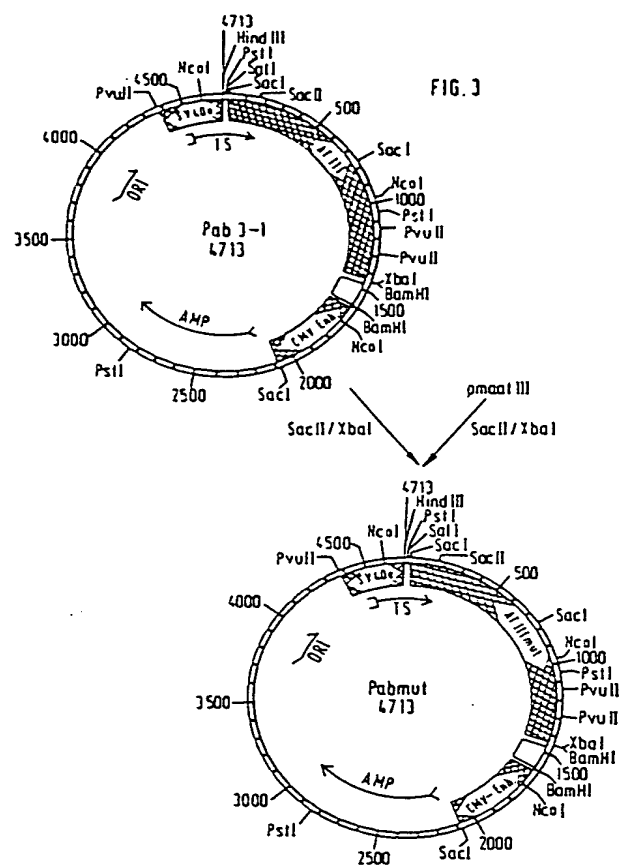
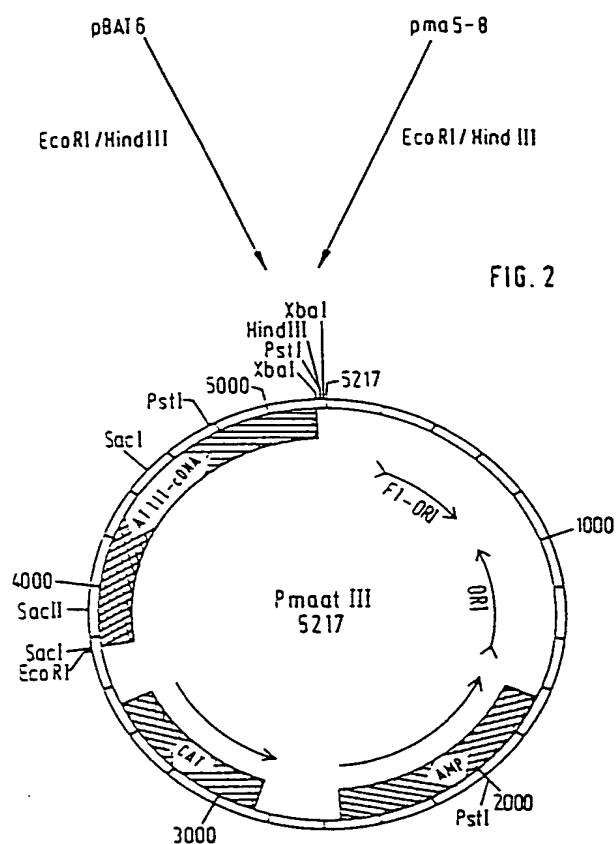
第4図は、AT III-血漿 (○)、AT III-WT (□)、AT III-Gln135 (●)、AT III-Gln155 (■) および AT III-Lys (▼) によるヒト  $\alpha$ -トロンビンの比阻害 (relative inhibition) の依存性を示す、説明図である。実験

条件は例4に記載されている。

出願人代理人 佐藤一雄







第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>3</sup>

	識別記号	庁内整理番号
C 07 H 21/04	B	7822-4 C
C 12 N 9/99		
C 12 P 21/02	C	8214-4 B
// C 12 N 15/15		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		

⑦発明者 アヒム、ベツカー ドイツ連邦共和国ダウトフエタル、オーバーラントシュトラーセ、4